

Инфекция человека респираторно-синцитиальным вирусом (RSV) варьирует от бессимптомного до тяжелого заболевания дыхательных путей. У младенцев и детей респираторно-синцитиальный вирус (RSV) рассматривается как одна из наиболее важных причин заболевания нижних дыхательных путей во всех географических зонах мира. RS вирус превосходит все другие микробные патогены в качестве причины пневмонии и бронхолита у младенцев до 1 года и является главной причиной летального заболевания дыхательных путей у таких младенцев.

Фактически все дети инфицируются в возрасте двух лет. Реинфекция имеет место с заметной частотой у детей старшего возраста и у молодых взрослых людей (Chanock et al., in *Viral Infections of Humans*, 3d ed., A.S. Evans, ed., Plenum Press, N. Y. (1989)). Хотя большая часть взрослых людей не имеет серьезных заболеваний, вызываемых инфекцией RS вирусом, пожилые больные и индивидуумы с нарушенной иммунной системой могут иметь тяжелые и, возможно, угрожающие жизни инфекции.

Лечение RSV инфекции было проблематичным. Маленькие дети имеют ослабленные ответные реакции в виде образования сывороточных и секреторных антител на антигены RSV и поэтому страдают от более тяжелых инфекций, тогда как кумулятивный иммунитет, по-видимому, защищает более старших детей и взрослых от серьезных форм этой инфекции. Было показано, что одно противовирусное соединение, рибавирин, может быть перспективным в лечении инфицированных младенцев в тяжелом состоянии, хотя не получены доказательства того, что оно сокращает продолжительность госпитализации или уменьшает необходимость поддерживающей терапии.

Механизмы иммунитета к инфекции RSV недавно стали центром внимания исследователей. По-видимому, секреторные антитела являются наиболее важными в защите верхних дыхательных путей, тогда как высокие уровни сывороточных антител, возможно, играют главную роль в устойчивости к инфекции RSV в нижних дыхательных путях. Очищенный человеческий иммуноглобулин, содержащий высокий титр нейтрализующих антител к RSV, может оказаться применимым в иммунотерапевтических подходах к лечению тяжелого заболевания нижних дыхательных путей у младенцев и детей младшего возраста. Однако препараты иммуноглобулина имеют серьезные недостатки, такие как возможность передачи находящихся в крови вирусов и трудности и большие расходы при их приготвлении и хранении.

Несмотря на настоятельную потребность в эффективной вакцине против RS вируса, в частности, для младенцев и детей младшего возраста, прежние попытки получения надежной и эффективной вакцины были неудачными. Вакцина с инактивированным формалином вирусом, исследованная в середине 1960-х годов, не давала защиты против инфекции RS вирусом или заболевания. Вместо этого заболевание обострялось при последующей инфекции RS вирусом. Kim et al., *Am. J. Epidemiol.* 89: 422-434, Chin et al., *Am. J. Epidemiol.* 89: 449-463 (1969); Kapikian et al., *Am. J. Epidemiol.* 89: 405-421 (1969).

Для того, чтобы обойти проблемы, связанные с инактивированными вакцинами и возможным изменением вируснейтрализующей антигенной детерминанты, усилия были направлены на получение анонсированных RS мутантов. Friedewald et al., *J. Amer. Med. Assoc.* 204: 690-694 (1968) сообщили о получении низкотемпературного пассированного мутанта RS вируса, который, по-видимому, обладал достаточной аттенуацией для того, чтобы быть кандидатом на вакцину. Этот мутант проявлял слегка увеличенную эффективность роста при 26°C по сравнению с родителем вирусом дикого типа, но его репликация была нечувствительной к температуре и не была адаптирована к холоду. Однако пассированный на холоде мутант был аттенуированным (ослабленным) для взрослых. Хотя этот мутант был достаточно аттенуированным и иммуногенным для младенцев и детей, ранее инфицированных RSV (например, серопозитивных индивидуумов), он сохранял низкий уровень вирулентности для верхних дыхательных путей серонегативных младенцев. Этот мутант был пассирован в культуре клеток почки быка при низкой температуре (26°C) и в результате приобрел аттенуирующие мутации круга хозяев. Приобретение этих мутаций позволяло мутанту эффективно реплицироваться в бычьих тканях, тогда как те же самые мутации ограничивали рост мутанта в дыхательных путях человека по сравнению с родителем штаммом A2 RSV.

Подобно этому, Garpure et al., *J. Virol.* 3: 414-421 (1969) сообщили о выделении чувствительных к температуре (ts) мутантов, которые также были перспективными кандидатами на вакцины. Один мутант, ts-1, был подвергнут детальному исследованию в лаборатории и на добровольцах. Мутант вызывал бессимптомную инфекцию у взрослых добровольцев и устойчивость к введению вируса дикого типа через 45 дней после иммунизации. Опять-таки, в то время как серопозитивные младенцы и дети подвергались бессимптомной инфекции, серонегативные младенцы обнаруживали признаки ринита и другие легкие симптомы. Кроме того, была обнаружена нестабильность ts фенотипа, хотя вирус, проявляющий частичную или полную потерю чувствительности к температуре, представлял небольшую часть извлекаемого из вакцин вируса и не был ассоциирован с иными признаками заболевания, чем легкий ринит.

Таким образом, эти исследования выявили, что пассированные на холоде и чувствительные к температуре штаммы были недостаточно аттенуированы и вызывали легкие симптомы заболевания у некоторых вакцинированных индивидуумов, в частности, у серонегативных младенцев, тогда как другие штаммы избыточно аттенуированы и не реплицируются в достаточном количестве для индуцирования защитных иммунных ответных реакций (Wright et al., *Infect. Immun.* 37:397-400 (1982)). Генетическая нестабильность, позволяющая мутантам-кандидатам на вакцины терять их устойчивый к температуре фенотип, также была нарушающим планом открытием (см.: Hodes et al., *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 145:1159-1164 (1974), McIntosh et al., *Pediatr. Res.* 8:689-696 (1974) и Belshe et al., *J. Med. Virol.* 3:101-110 (1978)).

Оставив подход, предусматривающий применение вакцин с аттенуированным RS вирусом, исследователи испытали потенциальные субъединичные вакцины, основанные на гликопротеинах

оболочки RS вируса, очищенных из лизатов инфицированных клеток. Эти гликопротеины индуцировали устойчивость к инфекции RS вирусом в легких хлопковых (cotton) крыс, Walsh et al., J. Infect. Dis. 155: 1198-1204 (1987), но индуцированные антитела имели очень слабую вируснейтрализующую активность, и иммунизация грызунов очищенной субъединичной вакциной приводила к усилению заболевания (Murphy et al., Vaccine. 8:497-502 (1990)).

Исследовались также вакцины, основанные на рекомбинантном вирусе осповакцины, который экспрессирует гликопротеин оболочки F или G. Эти рекомбинанты экспрессируют гликопротеины RSV, которые неотличимы от аутентичной вирусной копии, и мелкие грызуны, инфицированные внутрикожно рекомбинантными вирусами осповакцины, экспрессирующими F- и G-RSV, обнаруживали высокие уровни специфических антител, которые нейтрализовали инфекционность вируса. Действительно, инфицирование хлопковых крыс рекомбинантами вируса осповакцины - F стимулировало почти полную устойчивость к репликации RSV в нижних дыхательных путях и значительную устойчивость в верхних дыхательных путях. Olmsted et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7462-7466 (1986). Однако иммунизация шимпанзе рекомбинантами вирус осповакцины - F и вирус осповакцины - G почти не дала защиты против введения RSV (Collins et al., Vaccine 8:164-168 (1990)). Это привело к заключению, что этот подход, по-видимому, не сможет обеспечить удачной вакцины.

В то время как исследователи испытывали несколько различных подходов для получения эффективной и надежной RS вакцины в течение ряда лет, RS вирус оставался наиболее обычной причиной тяжелого вирусного заболевания нижних дыхательных путей у младенцев и детей. В результате остается настоятельная потребность в надежной вакцине, которая способна предотвратить серьезное заболевание в этой популяции, требующее часто госпитализации, и предотвращать заболевание у других индивидуумов. Совершенно удивительно, данное изобретение решает эти и близкие к ним проблемы.

Данное изобретение обеспечивает вакцинные композиции аттенуированного респираторно-синцитиального вируса. Аттенуированный вирус обеспечен в количестве, достаточном для индуцирования иммунного ответа в хозяине-человеке, в соединении с физиологически приемлемым носителем и может иногда содержать адъювант для усиления иммунного ответа хозяина. Изобретение рассматривает несколько различных антигенных подгрупп аттенуированного RS вируса, которые произведены из неполностью ослабленного RS вируса и обладают свойствами, до сих пор не обнаруживаемыми аттенуированными RS вирусами, описанными ранее в литературе. В одном из вариантов изобретения аттенуированный вирус содержит RS вирус с ограниченным кругом хозяев, неполностью ослабленный пассированием на холоде (cr RSV), в который введены, по меньшей мере, одна или несколько дополнительных мутаций для получения вируса и его потомства, имеющих чувствительный к температуре фенотип (ts), обозначаемый далее cpts RSV. В другом варианте RS вирус с ограниченным кругом хозяев, не полностью ослабленный пассированием на холоде (cr RSV), адаптируют к холоду (ca) пассированием при более пониженных температурах для введения дополнительных, ограничивающих рост, мутаций. Еще в одном варианте не полностью ослабленные ts мутанты RSV, такие как ts-4 и ts-1 NGI RSV, ослаблены далее введением дополнительных мутаций. Аттенуированные производные ts или cr штаммов получают несколькими путями, но, предпочтительно, введением дополнительных, чувствительных к температуре, мутаций при помощи химического мутагенеза, дальнейшим пассированием в культуре при ослабляющих температурах 20-24°C или введением мутаций малых бляшек (sp) и отбором производных, которые более ограничены в репликации, чем не полностью аттенуированный родительский мутантный штамм. Этот аттенуированный вирус изобретения принадлежит к антигенной подгруппе либо А, либо В, и вирус из обеих подгрупп может быть объединен в вакцинных препаратах для большего охвата преобладающих RSV инфекций. Вакцину обычно готовят в дозе 10^3 - 10^6 бляшкообразующих единиц (PFU) или в более высокой дозе для максимальной эффективности.

В других вариантах изобретение обеспечивает способы стимулирования иммунной системы индивидуума для индуцирования защиты против респираторно-синцитиального вируса. Способы предусматривают введение индивидууму иммуно-логически достаточного количества RSV, аттенуированного введением мутаций, которые придают характер ts, ca и(или) sp фенотипа RSV, исходно неполностью аттенуированному ts мутацией (мутациями) или пассированием при низкой температуре, например, при 26°C. Ввиду потенциальных тяжелых последствий инфекции RSV у новорожденных, серонегативных и серопозитивных младенцев и детей младшего возраста, а также у пожилых людей, иммунизация в соответствии с данными способами обычно наиболее полезна для этих индивидуумов. В большинстве случаев аттенуированный вирус вводят в дыхательные пути индивидуума, предпочтительно, интраназально в виде аэрозоля или капель.

В дальнейших вариантах изобретение обеспечивает чистые культуры аттенуированного RS вируса, в которых вирус был более полно аттенуирован дальнейшей дериватизацией идентифицированных ранее ts или cr мутантов. Этот аттенуированный вирус способен вызывать защитный иммунный ответ в инфицированном хозяине-человеке, но в то же время достаточно ослаблен, так что не вызывает нежелательных симптомов тяжелого респираторного заболевания в иммунизированном хозяине. Аттенуированный вирус может находиться в супернатанте клеточной культуры, может быть выделен из культуры или частично либо полностью очищен. Вирус может быть лиофилизирован и может быть соединен со множеством других компонентов для хранения или доставки хозяину, по желанию.

Данное изобретение обеспечивает RS вирус, пригодный для применения в качестве вакцины для человека. RS вирус, описанный здесь, получают введением дополнительных мутаций в штаммы во время роста вируса в клеточных культурах, к которым добавляют химический мутаген, отбором вируса,

подвергнутого пассивированию при субоптимальной температуре для введения ограничивающих рост мутаций, или отбором подвергнутого мутагенезу вируса, который продуцирует малые бляшки в клеточной культуре.

Таким образом, вакцина данного изобретения содержит аттенуированный RS вирус и физиологически приемлемый носитель. Вакцину вводят в иммуногенно достаточном количестве индивидууму, нуждающемуся в иммунологической защите против RS вируса, например, младенцу, ребенку, пожилым людям или взрослым для иммуносупрессивной терапии. Вакцина вызывает иммунный ответ, защищающий против серьезного заболевания нижних дыхательных путей, например, пневмонии и бронхолитита, при последующем инфицировании индивидуума RS вирусом дикого типа. Хотя циркулирующий в природе вирус еще способен вызывать инфекцию, в частности, в верхних дыхательных путях, в результате вакцинации очень сильно снижается возможность ринита и возможно повышение устойчивости при последующей инфекции вирусом дикого типа. После вакцинации образуются детектируемые уровни сывороточных и секреторных антител у хозяина, которые способны нейтрализовать гомологичный (той же самой подгруппы) вирус дикого типа *in vitro* и *in vivo*.

Во многих случаях антитела хозяина будут также нейтрализовать вирус дикого типа другой, невакцинной подгруппы. Для достижения более высоких уровней перекрестной защиты, т. е. защиты против гетерологичных штаммов другой подгруппы, предпочтительно вакцинировать индивидуумов аттенуированным вирусом, по меньшей мере, из одного предпочтительного штамма как подгруппы А, так и В.

Аттенуированный вирус, являющийся компонентом вакцины, находится в ней в выделенном и, обычно, очищенном виде. Под словом "выделенный" имеют в виду, что аттенуированный модифицированный RS вирус находится в другой среде по сравнению с обычной природной средой обитания вируса дикого типа, такой как носоглотка инфицированного индивидуума. Более конкретно, "выделенный" обозначает, что аттенуированный вирус находится в виде гетерологичного компонента в клеточной культуре или иной системы. Например, аттенуированный RS вирус данного изобретения может быть продуцирован инфицированной клеточной культурой, отделен от нее и добавлен к стабилизатору, содержащему другие, не встречающиеся в природе RS вирусы, например, вирусы, которые выбраны как аттенуированные по устойчивости к нейтрализующим моноклональным антителам к F-белку, как описано в одновременно представленном U. S. patent application attorney docket 15280-11-2, представленным здесь в виде ссылки.

Аттенуированный RS вирус данного изобретения обнаруживает очень заметное уменьшение вирулентности при сравнении с вирусом дикого типа, циркулирующего природно в людях. Аттенуированный вирус достаточно ослаблен, так что симптомы инфекции не наблюдаются в большинстве иммунизированных индивидуумов. В некоторых случаях аттенуированный вирус еще способен диссеминировать к невакцинированным индивидуумам. Однако его вирулентность достаточно подавлена, так что в вакцинированном или случайно хозяине не бывает серьезных инфекций нижних дыхательных путей.

Уровень аттенуации можно определить, например, определением количества вируса, присутствующего в дыхательных путях иммунизированного хозяина и сравнением этого количества с количеством, продуцируемым RS вирусом дикого типа или другими аттенуированными RS вирусами, которые оценивались как кандидаты вакцинных штаммов. Например, аттенуированный вирус данного изобретения имеет более высокую степень ограничения репликации в верхних дыхательных путях высокочувствительного хозяина, такого как шимпанзе, по сравнению с уровнями репликации вируса дикого типа, например, в 10-1000 раз меньше. Также уровень репликации аттенуированного вакцинного штамма RSV в верхних дыхательных путях шимпанзе был ниже, чем уровень репликации неполностью аттенуированного мутанта A2ts-1 RSV. Для дальнейшего снижения развития ринореи, связанной с репликацией вируса в верхних дыхательных путях, идеальный вакцинный вирус-кандидат должен проявлять пониженный уровень репликации, как в верхних, так и в нижних дыхательных путях. Однако аттенуированные вирусы данного изобретения должны быть достаточно инфекционными и иммуногенными в человеке для выработки защиты в вакцинированных индивидуумах. Способы определения уровней RS вируса в носоглотке инфицированного хозяина хорошо известны в литературе. Пробы получают аспирацией или вымыванием носоглоточных секретов (выделений), и количество вируса определяют при помощи лабораторного способа (см., например, Belshe et al., J. Med. Virology 1:157-162 (1977), Friedewald et al., J. Amer. Med. Assoc. 204: 690-694 (1968); Gharpure et al., J. Virol. 3:414-421 (1969) и Wright et al., Arch. Ges. Virusforsch. 41:238-247 (1973)). Вирус может быть измерен пригодным для этого способом в носоглотке хозяев-животных, таких как шимпанзе.

Для получения удовлетворительно аттенуированного производного вируса данного изобретения мутации вводится родительский вирусный штамм, который неполностью или частично аттенуирован, такой как ts-1 или ts-4 мутант или *cr* RSV. Для вируса подгруппы А предпочтительным неполностью аттенуированным родительским вирусом является ts-1 или ts-1 NG-1, или *cr* RSV, которые представляют собой мутанты штамма А2 подгруппы А или их производные, или субклоны.

Частично ослабленные мутанты вируса подгруппы В можно получить биологическим клонированием вируса подгруппы В дикого типа в приемлемом клеточном субстрате и получением из него мутантов пассивированием на холоде, а также при помощи химического мутагенеза с образованием ts мутантов или отбором мутантов, образующих малые бляшки. Различные способы отбора можно также комбинировать для получения частично аттенуированных мутантов подгрупп А или В, пригодных для дальнейшей, описанной здесь, дериватизации.

Как только отобран (отобраны) желаемый, частично аттенуированный, родительский штамм (штаммы), дальнейшее аттенуирование, достаточное для получения вакцины, приемлемой для применения в человеке, согласно данному изобретению, выполняется несколькими путями, как описано здесь.

Согласно данному изобретению, ср мутант может быть подвергнут дальнейшему мутагенезу различными путями. В одном из вариантов способ предусматривает пассирование частично ослабленного вируса в клеточной культуре при прогрессивно более низких, ослабляющих температурах. Например, в то время как вирус дикого типа в типичном случае культивируют, приблизительно, при 34-35°C, частично аттенуированные мутанты получают пассированием в клеточных культурах (например, в первичных клетках почек быков) при субоптимальных температурах, например, при 26°C. Эти мутанты имеют слабое, но четко выраженное доказательство адаптации к холоду (са), т. е. повышенную эффективность роста при 26°C по сравнению с родительским вирусом дикого типа, но обычно не тс. Так, в одном способе данного изобретения ср мутант или другой, частично ослабленный, штамм, например, тс-1 или сп, адаптируют для эффективного роста при пониженной температуре пассированием в клетках MRC-5 или Vero до температуры, приблизительно, 20-24°C, предпочтительно, 20-22°C. Этот отбор мутантного RS вируса во время холодного пассирования, в основном, исключает какую-либо остаточную вирулентность в производных штаммах по сравнению с частично аттенуированным родителем.

В другом варианте изобретения неполностью аттенуированные штаммы подвергают химическому мутагенезу для введения тс мутаций или, в случае вирусов, которые уже тс (чувствительны к температуре), дополнительные тс мутации достаточны для увеличения стабильности тс фенотипа аттенуированного производного. Способы для введения тс мутаций в RS вирус предусматривают репликацию вируса в присутствии мутагена, такого как 5-фторуридин или 5-фторурацил в концентрации приблизительно 10^{-3} - 10^{-5} M, предпочтительно, приблизительно 10^{-4} M или экспонирование вируса с нитрозогуанидином при концентрации приблизительно 100 мкг/мл в соответствии с общим способом, описанным, например, в Gharpure et al., J. Virol. 3:414-421 (1969) и Richardson et al., J. Med. Virol. 3:91-100 (1978). Можно использовать и другие химические мутагены. Аттенуирование может быть результатом тс мутации почти в любом гене RS вируса. Уровень температурной чувствительности репликации аттенуированного RS вируса изобретения определяют сравнением его репликации при разрезающей температуре с репликацией при нескольких ограничивающих температурах. Самая низкая температура, при которой репликация вируса снижается в 100 раз или более по сравнению с его репликацией при перmissive температуре, названа температурой выключения (shutoff). В экспериментальных животных и людях как репликация, так и вирулентность RS вируса коррелируют с температурой выключения мутанта. Репликация мутантов с температурой выключения 39°C умеренно ограничена, тогда как мутанты с температурой выключения 38°C размножаются менее хорошо, и симптомы болезни, в основном, ограничиваются верхними дыхательными путями. Вирус с температурой выключения 35-37°C должен быть полностью ослаблен в человеке. Так, аттенуированный RS вирус изобретения, который чувствителен к температуре, имеет температуру выключения в диапазоне приблизительно 35-39°C, предпочтительно, 35-38°C. Добавление свойства чувствительности к температуре частично аттенуированному штамму создает полностью аттенуированный вирус, применимый в вакцинных композициях данного изобретения.

В дополнение к критериям жизнеспособности, ослабленности и иммуногенности, свойства производного, которое отбирают, должны также быть насколько возможно стабильными, так, чтобы желаемые признаки сохранялись. Генетическая неустойчивость тс фенотипа после репликации *in vivo* была правилом для тс вирусов (Murphy et al., Infect. and Immun. 37:235-242 (1982)). Затем идеально, если вирус, применимый в вакцинах данного изобретения, сохраняет жизнеспособность, ослабленность, способность размножаться в иммунизированном хозяине (хотя и с низкими уровнями) и способность эффективно индуцировать иммунный ответ в вакцинированных индивидуумах, достаточный для защиты против серьезного заболевания, вызываемого последующей инфекцией вирусом дикого типа. Очевидно, что известные до сих пор и описанные мутанты RS вируса не отвечают всем этим критериям. Действительно, вопреки ожиданиям, основанным на результатах, сообщенных для известных аттенуированных RS вирусов, некоторые из вирусов данного изобретения, имеющие минимально две-три разные мутации, не только жизнеспособны и более ослаблены, чем прежние мутанты, но и более стабильны генетически *in vivo*, чем исследованные ранее мутанты, и сохраняют способность стимулировать защитный иммунный ответ и, в некоторых случаях, расширять защиту, полученную в результате множественных модификаций, например, индуцировать защиту против различных вирусных штаммов или подгрупп или защиту на различной иммунологической основе, например, на основе секреторных, а не сыворочных иммуноглобулинов, на основе клеточного иммунитета и т. п.

Аттенуированный вирус данного изобретения может быть размножен в ряде клеточных линий, которые пригодны для роста RS вируса. RS вирус растёт во многих человеческих и животных клетках. Предпочтительными клеточными линиями для размножения аттенуированного RS вируса, для применения в вакцинах, являются клетки DBS-FRhl-2, MRC-5 и Vero. Наибольшие выходы вируса обычно достигаются в гетероплоидных линиях, таких как клетки Vero. Обычно клетки инокулируют вирусом при множественности заражения в диапазоне 0,001-1,0 или более. Клетки культивируют при условиях, разрешающих репликацию вируса, например, при 30-37°C в течение 3-5 дней или так долго, как это необходимо для достижения требуемого титра. Вирус удаляют из клеточной культуры и отделяют от клеточных компонентов обычно хорошо известными способами, например, центрифугированием, и, если нужно, очищают далее при помощи способов, известных специалистам данной области.

Вирус, аттенуированный как описано здесь, может быть испытан в моделях *in vitro* и *in vivo* для подтверждения адекватного аттенуирования, генетической стабильности и иммуногенности для применения в вакцинах. В тестах *in vitro* модифицированный вирус тестируют на sp фенотип. Далее модифицированные вирусы тестируют в животных моделях RS инфекции. Описаны многие животные модели, которые суммированы в Meignier et al., eds., *Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Infection*, Merieux Foundation Publication (1991), даваемой в виде ссылки. Модель инфекции RSV хлопковых крыс описана в U. S. 4800078 и Prince et al., *Virus Res.* 3:193-206 (1985), включенных в ссылки. Эта модель, как считают, предсказывает аттенуирование и эффективность в человеке. Модель RS инфекции приматов с применением шимпанзе, предсказывает аттенуирование и эффективность в человеке и описана в деталях в Richardson et al., *J. Med. Virol.* 3:91-100 (1978); Wright et al., *Infect. Immun.*, 37:397-400 (1982); Crowe et al., *Vaccine* (1993) (in press), включенных в ссылки.

Например, было показано, что терапевтическое действие RSV нейтрализующих антител в инфицированных крысах было очень близким к последующему опыту с иммунотерапией обезьян и человека, инфицированных RSV. Действительно, хлопковая (cotton) крыса, по-видимому, является надежным экспериментальным заменителем для изучения ответа инфицированных обезьян и людей на иммунотерапию RSV нейтрализующими антителами. Например, количество RSV нейтрализующих антител, дающих терапевтический эффект на крысах, измеренный по уровню таких антител в сыворотке обработанных животных

(т. е. титр RSV нейтрализующей сыворотки 1:302-1:518) лежит в том же самом диапазоне, который продемонстрирован для обезьян (т. е. титр 1:539) или младенцев человека или детей младшего возраста (т. е. 1:877). Терапевтическое действие в крысах проявлялось в виде 100-кратного или большего снижения титра вируса в легком (Prince et al., *J. Virol.* 61: 1851-1854), тогда как в обезьянах терапевтическое действие проявлялось в виде

50-кратного снижения титра легочного вируса (Hemming et al., *J. Infect. Dis.* 152:1083-1087 (1985)). Наконец, терапевтическое действие в младенцах и детях младшего возраста, госпитализированных с тяжелым RSV бронхолитом или пневмонией, проявлялось в виде значительного увеличения оксигенации в подвергнутой лечению группе и значительного снижении количества RSV, извлекаемого из верхних дыхательных путей у прошедших лечение больных (Hemming et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1882-1886 (1987)). Следовательно, на основе этих исследований видно, что хлопковая крыса представляет собой удобную модель для предсказания успеха RSV вакцины у младенцев и детей младшего возраста. Другие грызуны, в том числе хомяки и мыши, должны быть также применимыми, поскольку эти животные могут допускать репликацию в них RSV и имеют температуру внутри тела, подобную температуре человека (Wight et al., *J. Infect. Dis.* 122:501-512 (1970) и Anderson et al., *J. Gen. Virol.* 71:(1990)).

Для применения в вакцинах аттенуированный вирус данного изобретения можно использовать непосредственно в препарате вакцины, или он может быть лиофилизирован, если желательно, при помощи известных протоколов лиофилизации. Лيوфилизированный вирус обычно хранят приблизительно при 4°C. Перед использованием лиофилизированный вирус воссоздают в стабилизирующем растворе, например, солевом растворе или в растворе, содержащем SPG, Mg^{++} и HEPES, с адьювантом или без него, как описано ниже.

Таким образом, RS вирусные вакцины изобретения содержат в качестве активного ингредиента иммуногенно эффективное количество аттенуированного RS вируса, как описано здесь. Аттенуированный вирус может быть введен в хозяина, в частности, человека, с физиологически приемлемым носителем и(или) адьювантом. Приемлемые носители хорошо известны в этой области и представляют собой, например, воду, со-держашую буферную воду, 0,4%-ный солевой раствор, 0,3%-ный глицин, гиалуроновую кислоту

и т. п. Полученные водные растворы могут быть упакованы для применения или лиофилизированы, причем лиофилизированный препарат соединяют со стерильным раствором перед введением, как упомянуто выше. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для создания близких к физиологическим условий, такие как корректоры pH и буферные средства, корректоры тоничности, смачивающие вещества и т. п., например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, сорбитанмонолаурат, олеат триэтаноламина и т. п.

При инокуляции композицией аттенуированного RS вируса, как описано здесь, через аэрозоль, капли, грубый спрей, пероральным, топическим или иным путем, наиболее предпочтительным для интраназальной доставки, иммунная система хозяина отвечает на вакцину образованием антител, как секреторных, так и сывороточных, специфических для белков RS вируса. В результате вакцинации хозяин становится, по меньшей мере, частично или полностью иммунным к инфекции RS вирусом или устойчивым к развитию умеренной или тяжелой RS вирусной инфекции, в частности, нижних дыхательных путей.

Вакцинные композиции, содержащие аттенуированный RS вирус данного изобретения, вводят лицу, восприимчивому к инфекции RS вирусом или по иной причине подвергающемуся опасности инфекции RS вирусом, для усиления собственной иммунной системы индивидуума. Такое количество определено как "иммуногенно эффективная доза". При этом точные количества зависят от состояния здоровья больного и его веса, способа введения, природы препарата и т. п., но находятся в диапазоне, приблизительно, 10^3 - 10^6 бляшкообразующих единиц (PFU) или более вируса на больного, более типично, приблизительно, 10^4 - 10^5 PFU вируса на больного. В любом случае вакцинные препараты должны обеспечить количество

аттенуированного RV вируса данного изобретения, достаточное для эффективной защиты больного против тяжелой или угрожающей жизни инфекции RS вирусом.

Аттенуированный RS вирус изобретения одной определенной RS подгруппы или одного штамма может быть соединен с аттенуированными вирусами другой подгруппы или других штаммов для получения защиты против множественных RS вирусов. В типичном случае различные модифицированные вирусы должны находиться в смеси и вводиться одновременно, но они могут вводиться и отдельно. Благодаря феномену перекрестной защиты среди определенных штаммов вируса, иммунизация одним штаммом может защищать против нескольких различных штаммов той же самой или другой подгруппы.

В некоторых случаях может быть желательным комбинирование вакцин аттенуированного вируса данного изобретения с вакцинами, которые индуцируют защитные ответные реакции на другие агенты, в частности, на другие, поражающие детей, вирусы. Например, вакцину данного изобретения можно вводить одновременно (в типичном случае - отдельно) или последовательно с вакциной против вируса парагриппа, как это описано в Clements et al., J. Clin. Microbiol. 29:1175-1182 (1991).

Можно проводить одноразовые или множественные введения вакцинных композиций изобретения. Для новорожденных и младенцев до 2 лет множественное введение может быть необходимым для индуцирования достаточных уровней иммунитета. Введение следует начинать на первом месяце жизни и продолжать с интервалами, например, в 2 месяца, шесть месяцев, один год и два года, что необходимо для поддержания достаточных уровней защиты против нативной (дикого типа) RS вирусной инфекции. Подобным образом взрослым, которые особенно восприимчивы к повторяющейся или тяжелой RS вирусной инфекции, например, работникам медико-санитарной помощи, дневной медицинской помощи, членам семей с детьми младшего возраста, пожилым людям, индивидуумам с нарушенной кардиолегочной функцией и т. д. могут быть необходимы многократные иммунизации для создания и(или) поддержания иммунных ответных реакций. Уровни индуцированного иммунитета могут отслеживаться путем измерения количеств нейтрализующих секреторных или сывороточных антител, и скорректированные дозировки или вакцинации могут повторяться, при необходимости, для поддержания желаемых уровней защиты.

Для иллюстрации (но не для ограничения) приведены следующие примеры.

Пример I

Выделение и характеристика полученных в результате мутагенеза производных пассированного на холоде RSV.

Этот пример описывает химический мутагенез неполностью аттенуированного ср RSV с ограниченным кругом хозяев для получения производных ts и sp штаммов, которые более сильно ослаблены и, следовательно, предпочтительны для применения в вакцинальных препаратах RSV.

Был приготовлен родительский исходный запас пассированного на холоде RSV (ср RSV). Вирус Flow Laboratories Lot 3131, родительский ср RSV, который неполностью аттенуировали в человеке, пассировали дважды в клетках MRC-5 при 25°C, в конце разбавляли в два раза в клетках MRC-5 при 25°C, затем пассировали три раза в клетках MRC-5 для получения суспензии ср RSV для мутагенеза.

ср RSV подвергали мутагенезу выращиванием родительской исходной популяции в MRC-5 клетках при 32°C в присутствии 5-фторурацила в среде при концентрации 4×10^{-4} М. В предварительных исследованиях было показано, что эта концентрация является оптимальной, поскольку она вызывала 100-кратное снижение титра вируса на 5-й день роста в культуре клеток по сравнению со средой без 5-фторурацила. Затем подвергнутую мутагенезу исходную популяцию анализировали методом бляшек (пятен) на клетках Vero, которые поддерживались под верхним слоем агара, и после определенного интервала инкубирования бляшки окрашивали красителем - нейтральным красным. 854 бляшки извлекали, и потомство каждой из тканевых культур инокулировали потомством одной бляшки, подвергнутого мутагенезу ср RSV, собирали отдельно, когда эффекты повреждения на клетках Vero казались максимальными. Потомство вируса, обнаруживающее чувствительный к температуре (ts) или содержащий малые бляшки (sp) фенотип, находили титрованием пулов бляшек на HEp-2 клетках при 32°C и 38°C. Каждый вирус, обнаруживающий sp фенотип (размер бляшек был уменьшен на 50% или более по сравнению с родительским вирусом при 32°C) или ts фенотип (100-кратное снижение титра при ограничивающей температуре 37°-40°C по сравнению с 32°C) оценивали далее. Эти штаммы биологически клонировали серийной очисткой бляшек на клетках Vero три раза и затем размножали на клетках Vero. Клонированные штаммы титровали при 32°, 37°, 38°, 39° и 40° (в тесте эффективности бляшкообразования (EOP)) для подтверждения их sp и ts фенотипов. Поскольку титры некоторых клонированных штаммов были относительно низкими даже при перmissive температуре (32°C), эти вирусы пассировали один раз в HEp-2 клетках, получая вирусные суспензии для анализа in vitro. Фенотипы потомства подвергнутого мутагенезу ср RSV представлены в табл. 1.

Одно из мутантных потомств имело фенотип малых бляшек, RSV cpsp-143 (sp обозначает фенотип малых бляшек (sp)), остальные мутантные потомства имели ts фенотип. RSV cpts мутанты обнаруживают вариации в способности продуцировать бляшки в монослойных культурах in vitro в диапазоне температур 37°C-40°C. Так, cpts 368 сохраняет способность продуцировать бляшки при 40°C, тогда как наиболее чувствительный к температуре (ts) вирус, cpts 248, не мог продуцировать бляшки при 38°C. Таким образом, некоторые из подвергнутых мутагенезу ср RSV потомств обнаруживают заметное отличие от родительского ср RS вируса в отношении чувствительности к температуре бляшкообразования.

Исследование репликации и генетической стабильности в мышцах.

Уровень репликации ср RSV потомства вируса в верхних и нижних дыхательных путях BAL В/с мышей изучали на следующем этапе исследований (таблица 2). Было обнаружено, что срts 530 и срts 248, два из наиболее чувствительных к температуре ts вирусов (см. табл. 1), имели в 7-12 раз сниженную репликацию в носовых раковинах мышей (таблица 2). Однако ни один из этих вирусов не был ограничен в репликации в легких, по сравнению с ср RSV родительским вирусом. Более строгое ограничение размножения в носовых раковинах, чем в легких, не является характерным для ts мутантов, которые обычно имеют более ограниченное размножение в более теплых нижних дыхательных путях (Richman and Murphy, Rev. Infect. Dis. 1:413-433 (1979)). Вирус, образовавшийся в легких и носовых раковинах, сохранял ts характер вошедшего вируса (данные не представлены). Эти открытия предполагают, что комбинация ts мутаций на фоне мутаций родительского ср вируса привела к ts потомству ср RSV с более высоким уровнем стабильности ts фенотипа после репликации *in vivo*, чем это было показано для изучаемых ранее ts мутантов.

Для дальнейшего изучения уровня генетической стабильности ts фенотипа потомств ср RSV эффективность бляшкообразования вируса, присутствующего в легких и в носовых раковинах мышей, исследовали для двух потомств подвергнутого мутагенезу ср RSV, которые были среди наиболее чувствительных к температуре (ts) потомств, а именно: ts 248 и ts 530. Голые мыши были выбраны, поскольку их иммунная система нарушена вследствие врожденного отсутствия функциональных Т-клеток, и вирус может реплицироваться в этом хозяине в течение более длительного периода времени. Более длительный период репликации благоприятствует появлению вирусных мутантов с измененным фенотипом. Вирус, присутствующий на 12-ый день (примечание: в нормальных мышцах в это время уже нельзя детектировать вирус), был охарактеризован и обнаружили, что он сохраняет неизменный ts фенотип (таблица 3). Как и ожидали, ts-1 мутант, включенный в тест в качестве положительного контроля, обнаруживал нестабильный ts фенотип *in vivo*. Таким образом, в противоположность прежней оценке ts мутантных вирусов в грызунах, эти результаты показывают, что после пролонгированной репликации в грызунах был достигнут высокий уровень стабильности ts фенотипа, что является важным и до сих пор не достигаемым очень желательным свойством вирусов данного изобретения.

В шимпанзе.

Далее уровень аттенуирования ts потомства ср RSV оценивали в серонегативных шимпанзе, хозяине, наиболее близком к человеку. Опыты на шимпанзе или совинолицых мартышках проводили согласно общему протоколу Richardson et al., J. Med. Virol. 3:91/100 (1979); Crowe et al., Vaccine (1993) (in press). Один мл суспензии, содержащей приблизительно 10^4 бляшкообразующих единиц (PFU) мутантного аттенуированного вируса, вводили интраназально каждому животному. Альтернативным способом является инокуляция RSV как в верхние, так и в нижние дыхательные пути в дозе 10^4 PFU к каждому сайту. Шимпанзе брали для взятия проб ежедневно в течение 10 дней, затем каждые 3-4 дня до 20-го дня. Пробы из нижних дыхательных путей шимпанзе брали при помощи трахеального лаважа согласно протоколу Snyder et al., J. Infect. Dis. 154:370-371 (1986) и Crowe et al., Vaccine (1993) (in press). Некоторых животных заражали спустя 4-6 недель вирусом дикого типа. Животных оценивали на признаки респираторного заболевания каждый день при взятии проб из носоглотки. Ринорея, оцениваемая от 0 до 4+, считалась сильным заболеванием верхних дыхательных путей при оценке 2+ или выше.

Вирус выделяли из проб-мазков из носа и горла и жидкостей трахеального лаважа путем инокуляции в чувствительные к RSV HEp-2 клетки, как описано выше. Количество вируса можно также определять непосредственно по методу бляшек с применением HEp-2 клеток, как описано Schnitzer et al., J. Virol. 17:431-438 (1976). Пробы крови брали перед введением вируса и через 3-4 недели после инокуляции для определения RSV нейтрализующих антител, как описано в Mills et al., J. Immunol. 107:123-130 (1970).

Наиболее ts и аттенуированное потомство ср RSV (ср RSV 248) исследовали и сравнивали с RSV дикого типа и родительским ср RSV (табл. 4). Репликация родительского ср RSV была слегка понижена в носоглотке по сравнению с диким типом, наблюдали снижение ринореи по сравнению с вирусом дикого типа, а также приблизительно 300-кратное уменьшение репликации вируса в нижних дыхательных путях по сравнению с вирусом дикого типа. Ясно, что ср вирус имел значительное ограничение репликации в нижних дыхательных путях шимпанзе, что является очень желательным признаком, не обнаруживаемым ранее при прежних оценках ср RSV в животных и человеке. Более важно то, что ср RSV 248 вирус имел 10-кратное ограничение размножения в носоглотке по сравнению с вирусом дикого типа, и это ограничение было связано с заметным уменьшением ринореи. Эти результаты показали, что это производное ср RSV обладает двумя крайне желательными свойствами для живой RSV вакцины, а именно: аттенуацией как в верхних, так и в нижних дыхательных путях высокочувствительных серонегативных шимпанзе. Далее оценивали уровень генетической стабильности вируса, присутствующего в дыхательных путях шимпанзе (таблица 5). Вирус, присутствующий в выделениях дыхательных путей, сохранял ts фенотип, и это было видно даже для вируса из шимпанзе 3 на 8-ой день, имеющего 100-кратное снижение титра при 40°C и обнаруживающего фенотип малых бляшек при 40°C, что свидетельствует о том, что его размножение все еще было чувствительным к температуре. Это наиболее генетически стабильный ts мутант, идентифицированный до настоящего времени. Увеличенная стабильность ts фенотипа вирусов ср RSV 248 и ср RSV 530 отражает влияние ср мутаций на генетическую стабильность тех мутаций, которые важны для ts фенотипа *in vivo*. Таким образом, ts мутации в сочетании с мутациями, присутствующими в родительском вирусе ср 3131, по-видимому, являются более стабильными, чем можно было бы ожидать в их отсутствие. Это важное свойство не было обнаружено и сообщено ранее. Инфицирование шимпанзе вирусом срts 248 индуцировало высокий титр

нейтрализующих антител, а также анти- тел к F и G гликопротеинам (таблица 6). Существенно, что иммунизация при помощи cpts 248 защищала животных от заражения RSV (таблица 7), что указывает на то, что этот мутант действует как эффективный вакцинный вирус в хозяине, близкородственном человеку.

Представленные здесь результаты свидетельствуют о том, что cpts 248 вирус обладает многими свойствами, желательными для живой RSV вакцины, в том числе: 1) аттенуацией для верхних и нижних дыхательных путей; 2) повышенной генетической стабильностью после репликации *in vivo* даже после пролонгированной репликации в животных с супрессией иммунного ответа; 3) удовлетворительной иммуногенностью; 4) значительной защитной эффективностью против заражения RSV дикого типа. Вирус cpts 530 имеет подобную чувствительность к образованию бляшек к температуре по сравнению с cpts 248, подобную степень ограничения размножения в носовых раковинах мышей и высокий уровень генетической стабильности в иммунонедостаточной голой мыши. Поэтому он также представляет собой вакцинный штамм RSV.

Дальнейшее аттенуирование.

Поскольку RS вирус вызывает больше симптомов заболевания нижних дыхательных путей у человека, чем у шимпанзе, и поскольку мутанты, которые удовлетворительно ослаблены для шимпанзе, могут быть недостаточно ослабленными для серонегативных младенцев и детей, производные cpts 248 и 530, обладающие нехарактерными свойствами ts мутантов, а именно: ограниченным размножением и аттенуированием в верхних дыхательных путях и высоким уровнем генетической стабильности, были подвергнуты дальнейшему мутагенезу.

Для дальнейшего исследования были выбраны потомства вирусов, которые обнаружили более высокую степень чувствительности к температуре *in vitro*, чем cpts 248, или которые имели фенотип малых бляшек. Мутантные производные cpts 248, обладающие одной или несколькими дополнительными ts мутациями, получали при помощи мутагенеза в присутствии 5-фторурацила (таблица 8). ts мутанты, более чувствительные к температуре (ts), чем cpts 248, были идентифицированы и некоторые из них имели фенотип малых бляшек (sp). Эти производные sp 248 вводили мышам. Мутанты cpts 248/804, 248/955, 248/404, 248/26, 248/18 и 248/240 были более ограничены в размножении в верхних и нижних дыхательных путях мышей, чем их родительский вирус cpts 248 (таблица 9). Таким образом, были идентифицированы жизнеспособные мутанты cpts 248, которые были более аттенуированы, чем cpts 248, и эти производные cpts 248 обнаружили широкий диапазон действия на размножение в мышах, причем ts 248/26 имел наибольшее ограничение размножения. ts фенотип вируса, присутствующий в носовых раковинах и легких мышей, был почти идентичен ts фенотипу введенного вируса, что свидетельствует о генетической стабильности. Высокоаттенуированное производное cpts 248, вирус cpts 248/404, был в 1000 раз более ограничен в размножении в носоглотке по сравнению с вирусом такого типа. Мутант cpts 248/404, обладающий по меньшей мере тремя аттенуированными мутациями, был также значительно ограничен в размножении в верхних и нижних дыхательных путях двух серонегативных шимпанзе и инфекция не вызывала ринореи (таблица 10). Этот вирус также обнаруживал высокую степень ограничения размножения по сравнению с диким типом, имея сниженную в 80000 раз репликацию в носоглотке и в 100000 раз - в легких. Тем не менее эти два шимпанзе были высокоустойчивы к последующему заражению RS вирусом дикого типа (таблица 11). Кроме того, были получены ts производные вируса cpts 530 (таблица 12). Эти результаты представляют собой дальнейшее усовершенствование в свойствах RS вирусов данного изобретения и также являются очень важным и значительным успехом в разработке вакцинных штаммов RS вируса.

Эти результаты были совершенно неожиданными, если основываться на опыте, приобретенном во время прежних исследований. Например, результаты более раннего исследования указывали на то, что *in vivo* свойства ts мутантов RSV, полученных в одном цикле мутагенеза с применением 5-фторурацила, не могут быть предсказаны *a priori*. Более того, хотя один из первых четырех ts мутантов, полученных этим способом, обнаруживал ту же самую температуру выключения бляшкообразования, что и другие мутанты, он был чрезмерно ослаблен при тестировании в восприимчивых шимпанзе и младенцах и детях младшего возраста (Wright et al., Infect. Immun. 37(1): 397-400 (1982). Это свидетельствовало о том, что получение ts фенотипа, приводящего к температуре выключения бляшкообразования 37°-38°C, не давало надежно мутанта с желаемым уровнем аттенуирования для восприимчивых шимпанзе, младенцев и детей. Действительно, эти результаты исследований с известными до сих пор мутантами были полностью не способны обеспечить какую-либо основу для вывода о том, что введение трех независимых мутаций (или множества мутаций) в RSV путем пассирования на холоде с последующими двумя последовательными циклами химического мутагенеза могут дать жизнеспособные мутанты, которые сохраняют инфекционность для шимпанзе (и путем экстраполяции - для младенцев) и обнаружат желаемый уровень аттенуирования, иммуногенности и защитную эффективность, требуемые для живой вирусной вакцины, которая могла бы применяться для предотвращения RSV заболевания.

Представленные выше результаты ясно демонстрируют, что определенные ts производные sp RSV данного изобретения являются инфекционными и обнаруживают значительную степень аттенуирования для мышей и шимпанзе. Эти производные ts мутанта аттенуированы и обнаруживают высокую генетическую стабильность после репликации *in vivo*. Эти мутанты также индуцируют значительную устойчивость к инфекции RSV у шимпанзе. Таким образом, эти производные sp RSV представляют собой вирусные штаммы, пригодные для применения в живых вакцинах, предназначенных для предотвращения тяжелого заболевания, вызываемого респираторно-синцитиальным вирусом у человека.

Пример II

Применение адаптации к холоду для аттенуирования ср RSV мутантов.

Этот пример описывает введение ограничивающих рост мутаций в неполностью аттенуированные ср RSV штаммы с ограниченным кругом хозяев, путем дальнейшего пассирования этих штаммов при все более сниженных температурах, для получения производных штаммов, более удовлетворительно аттенуированных для использования в вакцинах для человека. Эти подходы адаптации к холоду (са) были применены для введения дальнейшего аттенуирования в ср RSV 3131 вируса, который неполностью ослаблен в серонегативных детях.

При первой стратегии родительский исходный запас популяции пассированного на холоде RSV (ср RSV 3131), полученного из Flow Laboratories, был приготовлен пассированием в MRC-5 клетках при 25°C, как описано в примере I. Вкратце, пассированный на холоде вирус инокулировали в монослойную культуру MRC-5 или Vero клеток при множественности заражения $\leq 0,01$, и инфицированные клетки инкубировали в течение 3-14 дней перед последующим пассированием.

Вирус пассировали свыше 20 раз при 20-22°C для получения более ослабленного вируса. Способ быстрого пассирования, как только становился очевидным первое указание на репликацию вируса (т. е. 3-5 дней), был предпочтительным для отбора мутантов, способных эффективно реплицироваться при низких температурах. Дополнительно штамм RSV подгруппы B, St. Louis (14617) 85 клон IAI, был выделен из первичных клеток почек африканской зеленой марьяшки, а также пассирован и клонирован в MRC клетках (IAI-M C14) и пассирован на холоде 51 раз в этих клетках при 32-22°C. Вторая стратегия предусматривала применение биологически клонированного производного неклонированного родительского вируса ср RSV 3131. Вирус биологически клонировали в клетках почки эмбриона быка (BEK) (ткань, применяемая для исходного получения вируса ср RSV 3131, - см. Friedewald et al., J. Amer. Med. Assoc. 204:690-694 (1968). Клонированный вирус затем пассировали с 10-дневными интервалами в Vero клетках при низкой температуре. Альтернативно, вирус ср RSV 3131 клонировали конечным разведением (TD2P4) в MRC-5 клетках и пассировали с 10-дневными интервалами в Vero клетках.

Третья стратегия предусматривала отбор мутантов, продуцирующих бляшки при низкой температуре. Было идентифицировано производное вируса RSV ср 3131, названное plaque D1, продуцирующее большие бляшки при 25°C. Этот вирус получали из уровня третьего пассирования (P3) ср 3131-1 (BEK) ср 3131-17 (BEK) линии. Сами большую бляшку, продуцируемую P3 вирусом, размножали при 32°C, затем получали бляшки при 25°C. Опять выбирали самую большую бляшку, размножали и вновь получали бляшки. После пяти таких циклов был получен мутантный вирус D1 с большими бляшками. D1 клонировали биологически при помощи двух дополнительных циклов очистки при помощи повторения бляшкообразования.

Биологически клонированный вирус D1 образует заметно и равномерно большие бляшки при 25°C, чем ср 3131 или вирус A2 дикого типа. Таким образом, D1 адаптирован к холоду согласно критерию большого размера бляшек при 25°C. Предварительные исследования позволили предположить, что D1 не является чувствительным к температуре. При 37°C бляшки (D1 неотличимы от бляшек RSV дикого типа или ср 3131, что позволяет предположить, что D1 не ограничен в росте при этой температуре. В соответствии с этим D1 производит сильное цитопатогенное действие в монослоях Vero клеток при 37°C и 40°C (т.е. при самых высоких испытываемых температурах).

Пример III

Введение дальнейших аттенуирующих мутаций в ts RSV.

Этот пример описывает применение ts мутантов в качестве родительских вирусов для получения более полно аттенуированных штаммов. Для этого способа выбирали два ts мутанта RSV A2, а именно: ts-4 и ts-1 NG1. Для введения дополнительных мутаций в ts мутанты RSV были выбраны два разных способа. Во-первых, неполностью аттенуированный ts мутант RSV подвергали химическому мутагенезу и мутантные потомства, которые были более чувствительны к температуре относительно бляшкообразования, отбирали для дальнейшего анализа. Во-вторых, ts мутанты RSV пассировали при низкой температуре для отбора ts мутантов RSV с са фенотипом, т. е. с увеличенной способностью размножаться при субоптимальной температуре по сравнению с родительским вирусом дикого типа.

Родительскую исходную популяцию ts-1 NG-1 вируса готовили из ts-1 NG-1 мутанта живого RSV (A-2) из Flow Laboratories Lot M2, росшего в MRC-5 клетках. Этот мутант, полученный из ts-1 мутанта во втором цикле мутагенеза в присутствии 5-фторурацила, имеет две или более независимых ts мутаций, но все еще вызывает ринорею в восприимчивых к нему шимпанзе. Вирус пассировали дважды в Vero клетках при 32°C для получения ts-1 NG-1 суспензии для мутагенеза. Затем вирус выращивали в присутствии 4×10^{-4} М 5-фторурацила для индуцирования мутаций во время репликации или экспонировали с 5-азациитидином при 36°C после обработки 5-фторурацилом. Затем мутантную популяцию анализировали при помощи теста бляшкообразования на Vero клетках, которые выдерживали под верхним слоем агара и после определенного периода времени инкубации бляшки идентифицировали микроскопически. Затем извлекали 596 бляшек, и потомство каждой бляшки отдельно размножали при помощи роста на свежих монослоях Vero клеток. Содержимое каждой из культур ткани, инокулированных потомством отдельной бляшки мутагенизированного вируса ts-1 NG-1, собирали отдельно при достижении максимальных цитопатогенных эффектов на Vero клетках. Потомство вируса, более чувствительное к температуре, чем ts-1 NG-1, находили титрованием пулов бляшек на HEp-2 клетках при 32°C и 36°C. Каждый вирус, обнаруживающий большую чувствительность к температуре, чем ts-1 NG-1 (т. е. 100-кратное снижение титра при ограничивающей температуре (36°C) по сравнению с 32°C), оценивали далее. Были идентифицированы шесть потомств бляшек, более ts, чем ts-1 NG-1 RSV. Эти штаммы клонировали биологически серийной очисткой с применением бляшкообразования на Vero клетках

(3 раза) и затем размножали на Vero клетках. Клонированные штаммы титровали при 32°C, 35°C, 36°C, 37°C и 38°C (тестом эффективности бляшкообразования) для подтверждения их ts фенотипов. Данные эффективности бляшкообразования, полученные на HEp-2 клетках, дали дальнейшее подтверждение фенотипов шести мутантов (таблица 13).

Два наиболее ts (чувствительных к температуре) вируса, A-20-4 и A-37-8, были сильно аттенуированы в мышах по сравнению с их родительским вирусом ts-1 NG-1, что свидетельствует о том, что приобретение увеличенного уровня чувствительности к температуре сопровождается увеличенной аттенуацией (таблица 14). Эти вирусы были инфекционными для мышей, так как они индуцировали образование антител. Вирус ts-1 NG-1/A-20-4 аттенуирован для шимпанзе (таблица 15) и инфицирование шимпанзе ts-1 NG-1/A-20-4 вызывало устойчивость к заражению вирусом дикого типа (таблица 16). Важным является то, что ринорея не наблюдалась.

Проводили также мутагенез вируса ts-4 при помощи того же способа, который применяли для мутагенеза вируса ts-1 NG-1. Пять потомств бляшек, более чувствительных к температуре, чем родительский вирус ts-4 RSV, были идентифицированы (таблица 17). Мутации были введены также в ts-1 NG-1 и ts-4 вирусы пассированием на холоде. Вирус ts-4 размножается до высокого титра при 22°C после 38 пассирований на холоде.

Исследования на человеке.

Аттенуированный вирус изобретения вводили человеку в соответствии с хорошо упрочившимися протоколами для RS вакцин, предназначенных для человека, описанных, например, Wright et al., Infect. Immun. 37:397-400 (1982). Kim et al., Pediatrics 52:56-63 (1973) и Wright et al., J. Pediatr. 80:931-936 (1976), которые включены в качестве ссылки. Вкратце, взрослых или детей инокулировали интраназально в виде капель с 10^3 - 10^5 PFU аттенуированного вируса на мл в объеме 0,5 мл. Образование антител оценивали фиксацией ком-племента, нейтрализацией бляшек и(или) твердо-фазным иммуноферментным анализом. Наблюдалось появление признаков и симптомов заболевания верхних дыхательных путей у индивидуумов. Как и при введении шимпанзе, аттенуированный вирус вакцины растет в носоглотке вакцинированных индивидуумов при уровнях, приблизительно более чем в 10 раз более низких по сравнению с уровнями вируса дикого типа и приблизительно в 10 раз или менее при сравнении с уровнями sp RSV или другого, неполностью аттенуированного родительского штамма. Последующие иммунизации проводили периодически, по необходимости, для поддержания достаточных уровней защитного иммунитета.

Из вышесказанного должно быть понятно, что хотя здесь описаны специфические варианты изобретения для иллюстрации и понимания, могут быть введены различные модификации без отхода от духа и сферы действия данного изобретения. Соответственно этому, изобретение не ограничивается за исключением ограничений, указанных в формуле изобретения.

Эффективность бляшкообразования девяти производных пассированного на холоде RSV (cpts или csp мутантов) в HEp-2 клетках при разрешающей и ограничивающих температурах

Вирус	Титр вируса (\log_{10} PFU (мл) при указанной температуре ($^{\circ}\text{C}$))					Температура выключения ($^{\circ}\text{C}$) ¹	Малые бляшки при 32 $^{\circ}\text{C}$
	32	37	38	39	40		
Дикий тип A2	5,5	4,4	4,5	3,8	3,8	40	нет
cp -RSV	6,0	5,8	5,8	6,2	5,4	40	нет
ts-1	5,7	4,5	2,7	2,4	1,7*	38	нет
csp-143	4,2*	4,1*	3,8*	3,9*	3,8*	40	нет
cpts-368	6,7	6,3	6,1*	5,8**	2,0**	40	нет
cpts-274	7,3	7,1	6,6	5,8*	1,0**	40	нет
cpts-347	6,2	6,1	5,7*	5,5**	<0,7	40	нет
cpts-142	5,7	5,1	4,5*	3,7**	<0,7	39	нет
cpts-299	6,2	5,5	5,1*	2,0**	<0,7	39	нет
cpts-475	5,4	4,8*	4,2**	<0,7	<0,7	39	нет
cpts-530	5,5	4,8*	4,5*	<0,7	<0,7	39	нет
cpts-248	6,3	5,3**	<0,7	<0,7	<0,7	38	нет

¹ Температура выключения определена как самая низкая температура, при которой наблюдается 100 -кратное или большее снижение титра бляшек (отчетливые цифры в таблице).

* Фенотип малых бляшек (менее 50% от размера бляшек дикого типа).

**Фенотип точечных бляшек (менее 10% от размера бляшек дикого типа).

Таблица 2

Репликация cpts RSV мутантов в BALB/c мышах¹

Животные, инфицированные	Титр вируса при 32 $^{\circ}\text{C}$ (средняя величина \log_{10} PFU/г ткани из тканей восьми животных \pm стандартная ошибка)				
	Температура выключения вируса ($^{\circ}\text{C}$)	4-ый день		5-ый день	
		Носовые раковины	Легкие	Носовые раковины	Легкие
дикий тип A2	>40	5,0 \pm 0,16	5,8 \pm 0,20	5,0 \pm 0,11	5,8 \pm 0,19
cp-RSV	>40	4,7 \pm 0,07	5,3 \pm 0,18	4,8 \pm 0,16	5,3 \pm 0,21
ts-1	38	4,0 \pm 0,19	4,7 \pm 0,27	3,8 \pm 0,33	4,9 \pm 0,13
csp-143	>40	4,5 \pm 0,14	4,1 \pm 0,37	4,4 \pm 0,39	4,6 \pm 0,39
cpts-368	40	4,8 \pm 0,15	5,1 \pm 0,35	4,7 \pm 0,08	5,4 \pm 0,23
cpts-274	40	4,2 \pm 0,19	5,0 \pm 0,15	4,2 \pm 0,11	5,1 \pm 0,55
cpts-347	40	4,4 \pm 0,32	4,9 \pm 0,40	4,5 \pm 0,33	5,2 \pm 0,35
cpts-142	39	4,1 \pm 0,34	5,0 \pm 0,19	4,3 \pm 0,24	5,8 \pm 0,40
cpts-299	39	3,9 \pm 0,11	5,2 \pm 0,15	3,9 \pm 0,32	5,0 \pm 0,29
cpts-475	39	4,0 \pm 0,18	5,3 \pm 0,25	4,1 \pm 0,23	4,9 \pm 0,42
cpts-530	39	3,9 \pm 0,18	5,3 \pm 0,15	3,9 \pm 0,14	5,3 \pm 0,19
cpts-248	38	3,9 \pm 0,33	5,1 \pm 0,29	4,2 \pm 0,13	5,5 \pm 0,35

¹ Мышам вводили 10^{6,3} PFU интраназально в 0,1 мл инокулята на 0-ой день, затем убивали на 4-ый день или 5-ый день.

Таблица 3

Генетическая стабильность RSV cpts-248 и cpts-530 после пролонгированной репликации
в голых мышах

Животные инфицированные	Сбор ткани или введение тест- вируса	Эффективность бляшкообразования при присутствующего в носовых раковинах убитых через 12 дней после					
		32°C			37°C		
		Количество животных	% животных с детектируемы м вирусом	Средний титр (log ₁₀ PFU/г ткани или на мл инокулят а)	% животных с детектируемы м вирусом	% животных с вирусом с измененны м ts фенотипо м	Средний титр (log ₁₀ PFU/г ткани или на мл инокулят а)
cpts-248	носовые раковины	19	100	3,8±0,34	0	0	<2,0
"-	легкие	19	90	2,0±0,29	0	0	<1,7
cpts-530	носовые раковины	20	100	3,0±0,26	0	0	<2,0
"-	легкие	20	100	2,4±0,29	0	0	<1,7
ts-1	носовые раковины	19	100	3,7±0,23	74	74	2,7±0,57
"-	легкие	19	100	2,5±0,30	74	74	1,8±0,21
	cpts-248	-	-	4,9	-		<0,7
	cpts-530	-	-	5,5	-		3,7*
	ts-1	-	-	6,1	-		3,3

¹ Указанные титры бляшек обозначают средний log₁₀ PFU/г ткани из 19 или 20 проб ± стандартная ошибка

² Каждое животное получило 10^{6,3} PFU интраназально в 0,1 мл инокулята указанного вируса в 0-й день

* Только фенотип малых бляшек

Таблица 4

Репликация cpts-RSV-248, cp-RSV или RSV A2 дикого типа в верхних и нижних дыхательных путях
серонегативных шимпанзе

Животное, инфициро- ванное вирусом	Путь иноку- лирова- ния ^a	Количе- ство шим- панзе	Извлечение вируса					
			Носоглотка		Трехея		Ринорея баллы	
			Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Среднее ^c	Пик
cpts-248	IN+IT	1	10	4,6	8 ^d	5,4	0,2	1
	IN+IT	2	10	4,5	6	2,2	0,1	1
	IN+IT	3	9	4,7	10	2,1	0,1	1
	IN+IT	4	9	4,2	8 ^d	2,2	0,1	1
			среднее 9,5	среднее 4,5	среднее 8,0	среднее 3,0	среднее 0,1	
cp-RSV	IN	5	20	5,3	8 ^d	2,9	1,0	3
	IN	6	16	5,8	6 ^d	3,0	1,8	3
	IN+IT	7	13	4,3	6 ^d	3,0	0,6	1
	IN+IT	8	16	5,0	10 ^d	2,8	0,5	1
			среднее 16	среднее 5,1	среднее 7,7	среднее 2,9	среднее 1,0	

Продолжение таблицы 4

Животное, инфициро-	Путь иноку-	Количе- ство	Извлечение вируса		
			Носоглотка	Трехея	Ринорея баллы

вирус	лиро- вания ^a	шим- панзе	Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Среднее ^c	Пик
Дикий тип A2	IN	9	9	5,1	1,3	5,4	1,0	1
	IN	10	9	6,0	8	6,0	1,7	4
	IN+IT	11	13	5,3	8	5,9	2,1	3
	IN+IT	12	9	5,4	8	5,6	1,0	3
			среднее 10	среднее 5,5	среднее 9,3	среднее 5,7	среднее 1,4	

^a IN = только интраназальное введение, при дозе 10⁴ PFU в 1,0 мл инокулята; IN+IT = как интраназальное, так и интратрахеальное введение, 10⁴ PFU в 1,0 мл инокулята в каждом месте

^b Указывает последний день постинфекционного периода, в который извлекали вирус

^c Средний балл ринореи обозначает сумму дневных баллов за 8 дней (до и после дня максимума), разделенную на 8. Наивысший балл – 4, самый низкий – 0

^d Вирус, выделенный только в указанный день

Таблица 5

Генетическая стабильность вируса, присутствующего в исходных мазках из носоглотки (NP) или в пробах трахеального лаважа (TL), полученных из животных, экспериментально инфицированных cpts-RSV-248

Количество шимпанзе	NP мазок или проба TL	Вирус, полученный в постинфек- ционный день	Титр RSV при указанной температуре (log ₁₀ PFU/мл)		
			Титр при 32°C	Титр при 39°C	Титр при 40°C
1 ^a	NP	3	3,2	<0,7	NT
	"	4	2,7	<0,7	NT
	"	5	4,2	<0,7	NT
	"	6	3,8	<0,7	NT
	"	7	4,6	<0,7	NT
	"	8	4,5	<0,7	NT
	"	9	2,6	<0,7	NT
	"	10	2,0	<0,7	NT
	TL	6	5,4	<0,7	NT
2 ^a	"	8	2,7	<0,7	NT
	NT	3	3,2	<0,7	NT
	"	4	3,7	<0,7	NT
	"	5	4,5	<0,7	NT
	"	6	4,1	<0,7	NT
	"	7	3,3	<0,7	NT
	"	8	4,2	<0,7	NT
	"	9	2,8	<0,7	NT
	"	10	1,6	<0,7	NT
3	TL	6	2,2	<0,7	NT
	NP	3	2,7	<0,7	<0,7
	NP	4	3,4	<0,7	<0,7
	NP	5	2,9	<0,7	<0,7
	NP	6	3,3	<0,7	<0,7
	NP	7	3,4	0,7 ^b	<0,7
	NP	8	4,7	3,5 ^b	2,0 ^c
	NP	9	1,9	<0,7	<0,7
	TL	6	1,8	<0,7	<0,7
	"	8	1,9	1,2 ^b	<0,7
	"	10	2,1	1,3 ^b	<0,7

Продолжение таблицы 5

Количество шимпанзе	NP мазок или проба TL	Вирус, полученный в постинфек- ционный день	Титр RSV при указанной температуре (log ₁₀ PFU/мл)		
			Титр при 32°C	Титр при 39°C	Титр при 40°C
4	NP	3	3,2	<0,7	NT

	NP	4	2,7	<0,7	NT
	NP	5	3,4	<0,7	NT
	NP	6	3,3	<0,7	NT
	NP	7	4,2	<0,7	NT
	NP	8	3,5	<0,7	NT
	NP	9	2,1	<0,7	NT
	TL	8	2,2	<0,7	NT

NT - не определяли

^a Изоляты (пассированные один раз вирусные суспензии со средним титром \log_{10} PFU/мл 4,0) получали для проб из шимпанзе из каждого исходного образца, содержащего вирус носоглоточного мазка или образца трахеального лаважа и тестировали на эффективность бляшкообразования при 32°, 39° и 40°C. Ни один из изолятов не был способен образовывать бляшки при 39°C или 40°C. Изоляты из шимпанзе 3 и 4 не тестировали этим способом

^b Процент титра при 39°C по сравнению с титром при 32°C: NP мазок на 7-ой день = 0,2%, NP мазок на 8-й день = 6%, TL на 8-ой день - 20%. TL, на 10-й день = 16%. Все бляшки были только бляшками малого размера (фенотип малых бляшек); не было бляшек с размером бляшек дикого типа

^c Процент титра при 40°C по сравнению с титром при 32°C был 0,2. Все бляшки были бляшками точечного фенотипа; размер бляшек дикого типа не был обнаружен

Таблица 6

Образование сывороточных антител в ответ на инфицирование шимпанзе RSV cpts-248, cp-RSV или RSV A2 дикого типа

Животные, иммунизированные	Количество шимпанзе	Титры сывороточных антител (обратные средства \log_2)					
		Нейтрализация		ELIS A-F		ELIS A-G	
		0-ой	28-ой	0-й	28-ой	0-й	28-ой
		дни					
cpts -248	4	3,3	10,7	7,3	15,3	6,3	9,8
cp- RSV	4	3,3	11,2	11,3	15,3	9,3	12,3
RSV A2 дикого типа	4	3,3	11,2	8,3	15,3	7,3	10,3

Таблица 7

Иммунизация шимпанзе cpts-248 индуцирует устойчивость к введению на 28-й день вируса RSV A2 дикого типа

Вирус, примененный для иммунизации животного	Количе- ство шимпанзе	Ответ на введение 10 ⁴ PFU вируса дикого типа, введенного на 28-й день							
		Извлечение вируса				Ринорея (баллы)		Титр сывороточных нейтрализующих антител (обратный log ₂) на указанный день	
		Носоглотка		Трахея					
		Продол- житель- ность (дни)	Макси- мальный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Про- должи- тель- ность (дни)	Максимальный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Среднее ^a	Пик	28-й день	42-й или 56-й день
cpts-248	1	5	2,7	0	<0,7	0	0	10,1	11,0
	2	9	1,8	0	<0,7	0	0	10,3	14,5
cp-RSV	5	5	1,0	0	<0,7	0	0	11,1	13,3
	6	8	0,7	0	<0,7	0	0	11, 4	12,9

Продолжение таблицы 7

Вирус, примененный	Количество	Ответ на введение 10^4 PFU вируса дикого типа, введенного на 28-й день							
		Извлечение вируса				Ринорея		Титр	

для иммунизации животного	шимпанзе	Носоглотка		Трахея		(баллы)		сывороточных нейтрализующих антител (обратный log ₂) на указанный день	
		Продол- житель- ность (дни)	Макси- мальный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Про- должи- тель- ность (дни)	Максимальный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Среднее ^a	Пик	28-й день	42-й или 56-й день
никакой	9	9	5,1	13	5,4	1,0	1	<3,3	12,4
	10	9	6,0	8	6,0	1,7	4	<3,3	13,2
	11	13	5,3	8	5,9	2,1	3	<3,3	11,6
	12	9	5,4	8	5,6	1,0	3	<3,3	11,2

^a Средний балл ринореи обозначает сумму баллов за 8 дней максимального выделения вируса, разделенную на 8. Наивысший балл - 4. Балл 0 указывает, что ринорея не обнаруживалась ни в один из 8 дней наблюдения.

Таблица 8

Эффективность бляшкообразования 10 мутантов, полученных из RSV-cpts-248
дополнительным мутагенезом с применением 5-фторурацила

Вирус	Титр вируса (log ₁₀ PFU/мл) при указанной температуре (°C)							Температура выключения (°C) ¹	Малые бляшки при 32°C
	32	35	36	37	38	39	40		
А 2 дикого типа	4,5	4,6	4,4	4,5	4,5	3,8	3,8	>40	нет
ср-RSV	4,7	4,4	4,3	4,3	4,2	3,7	3,5	>40	нет
ts-1	5,6	5,4	4,0	4,4	2,7	2,0	0,7	38	нет
cpts-248	3,4	3,0	2,6*	1,7**	<0,7	<0,7	<0,7	38	нет
248/1228	5,5*	5,3*	5,3**	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	37	да
248/1075	5,3*	5,3*	5,1**	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	37	да
248/1075	4,5	4,2	4,2*	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	37	нет
248/967	4,4	3,7	3,6*	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	37	нет
248/804	4,9	4,5	4,0*	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	37	нет
248/955	4,8	3,7	2,8*	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	36	нет
248/404	3,6	2,9*	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	36	нет
248/26	3,1	2,9*	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	36	нет
248/18	4,0*	4,0**	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	36	да
248/240	5,3*	5,7**	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	36	да

¹ Температура выключения определена как самая низкая ограничивающая температура, при которой наблюдается 100-кратное или большее снижение титра бляшек в HEp-2 клетках (отчетливые цифры в таблице)

* Фенотип малых бляшек (менее 50% от размера бляшек дикого типа)

** Фенотип с точечными (с булавочную головку) бляшками (менее 10% от размера бляшек дикого типа)

Таблица 9

Репликация и генетическая стабильность 10 мутантов, полученных из RSV cpts-248 в BALB/c мышах¹

Вирус, применен-	Темпера- тура вы-	Титр вируса (средний log ₁₀ PFU/г ткани шести животных ± стандартная ошибка)	
		Носовые раковины	Легкие

ный для инфициро- вания животных	ключения вируса (°C)	32°C	36°C	37°C	38°C	32°C	36°C	37°C	38°C
A2 дикого типа	>40	5,1±0,15	5,2±0,23	5,2±0,14	5,2±0,27	6,1±0,14	5,8±0,23	6,0±0,12	5,9±0,17
cp-RSV	>40	4,9±0,20	5,1±0,16	4,9±0,24	4,9±0,22	6,0±0,16	5,9±0,23	5,6±0,15	5,6±0,13
ts-1	38	3,9±0,25	2,7±0,27	2,4±0,42	2,5±0,29	4,1±0,21	3,5±0,23	2,6±0,18	2,0±0,23
cpts-248	38	4,0±0,16	2,5±0,34	<2,0	<2,0	4,4±0,37	1,8±0,15	<1,7	<1,7
248/1228	37	4,1±0,15	2,4±0,48	<2,0	<2,0	2,0±0,37	<1,7	<1,7	<1,7
248/1075	37	4,2±0,18	2,4±0,40	<2,0	<2,0	5,5±0,16	3,5±0,18	<1,7	<1,7
248/965	37	3,8±0,23	<2,0	<2,0	<2,0	4,5±0,21	3,4±0,16	<1,7	<1,7
248/967	37	4,4±0,20	<2,0	<2,0	<2,0	5,4±0,20	3,6±0,19	<1,7	<1,7
248/804	37	2,9±0,19	<2,0	<2,0	<2,0	3,6±0,19	<1,7	<1,7	<1,7
248/955	36	3,2±0,10	<2,0	<2,0	<2,0	3,2±0,22	<1,7	<1,7	<1,7
248/404	36	2,1±0,31	<2,0	<2,0	<2,0	4,4±0,12	1,8±0,20	<1,7	<1,7
248/26	36	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	2,3±0,20	<1,7	<1,7	<1,7
248/18	36	2,9±0,99	<2,0	<2,0	<2,0	4,3±0,23	1,8±0,15	<1,7	<1,7
248/240	36	2,9±0,82	<2,0	<2,0	<2,0	3,9±0,12	<1,7	<1,7	<1,7

¹ Мышам вводили $10^{6,3}$ PFU интраназально при легкой анестезии на 0-ой день, затем убивали удушением CO₂ на 4-й день

Таблица 10

Репликация cpts-RSV-248/404, cpts 248/18, cpts-RSV 248, cp-RSV или RSV A2 дикого типа
в верхних и нижних дыхательных путях серонегативных шимпанзе

Животное, инфициро- ванное указанным вирусом	Путь инокули- рования	Коли- чест- во шим- панзе	Извлечение вируса				Ринорея, баллы	
			Носоглотка		Трахея		Среднее ^c	Пик
			Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)		
cpts- 248/404	IN + IT	13	0	<0,7	0	<0,7	0	0
	IN + IT	14	0	<0,7	0	<0,7	0	0
cpts-248 #	IN + IT	1	10	4,6	8 ^d	5,4	0,2	1
	IN + IT	2	10	4,5	6	2,2	0,1	1
	IN + IT	3	9	4,7	10	2,1	0,1	1
	IN + IT	4	9	4,2	8 ^d	2,2	0,1	1
			среднее 9,5	среднее 4,5	среднее 8,0	среднее 3,0	среднее 0,1	среднее 1,0
cp – RSV #	IN	5	20	5,3	8 ^d	2,9	1,0	3
	IN	6	16	5,8	6 ^d	3,0	1,8	3
	IN + IT	7	13	4,3	6 ^d	3,0	0,6	1
	IN + IT	8	16	5,0	10 ^d	2,8	0,5	1
			среднее 16	среднее 5,1	среднее 7,5	среднее 2,3	среднее 1,0	среднее 2,0

Продолжение таблицы 10

Животное, инфициро- ванное указанным вирусом	Путь инокули- рования	Коли- чест- во шим- панзе	Извлечение вируса				Ринорея, баллы	
			Носоглотка		Трахея		Среднее ^c	Пик
			Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)		

дикий тип A2	IN	9	9	5,1	13	5,4	1,0	1
	IN	10	9	6,0	8	6,0	1,7	4
	IN + IT	11	13	5,3	8	5,9	2,1	3
	IN + IT	12	9	5,4	8	5,6	1,0	3
			среднее 10	среднее 5,5	среднее 9,3	среднее 5,7	среднее 1,4	среднее 2,8

^a IN = только интраназальное введение; IN+IT = как интраназальное так и интратрахеальное введение

^b указывает последний день постинкубационного периода, в который извлекали вирус

^c средний балл ринореи обозначает сумму дневных баллов за период 8 дней (до и после пика выделения вируса), разделенную на 8

^d вирус, выделенный только в указанный день

^e не определяли

животные, включенные в таблицы 4 и 7

Таблица 11

Иммунизация шимпанзе cpts-248/404 индуцирует устойчивость к введению на 28-й день
RSV A2 дикого типа

Вирус, примененный для иммунизации животного	Коли- чество шим- панзе	Извлечение вируса						Титр сывороточных нейтрализующих антител (обратный log ₂) на указанный день	
		Носоглотка		Трахеальный лаваж		Ринорея (баллы)			
		Продол- житель- ность (дни)	Максима- льный титр (log ₁₀ PFU на мл)	Продол- житель- ность (дни)	Максима- льный титр (log ₁₀ PFU на мл)	Сред- нее ^a	Пик	28-й день	42-ой или 56-ой день
cpts-248/404	13	0	0,7	0	<0,7	0	0	NYT	NYT
	14	8	3,4	0	<0,7	0	0	NYT	NYT
		средн.4,0	средн.2,0	средн.0	средн.<0,7	средн.0	средн.0		
cpts-248 #	1	5	2,7	0	<0,7	0	0	10,1	11,0
	2	9	1,8	0	<0,7	0	0	10,3	14,5
		средн. 7,0	средн. 2,3	средн.0	средн.<0,7	средн.0	средн. 0	средн. 10,2	средн. 12,8
cp-RSV #	5	5	1,0	0	<0,7	0	0	11,1	13,3
	6	8	0,7	0	<0,7	0	0	11,4	12,9
		средн.6,5	средн.0,9	средн.0	средн.0,7	средн.0	средн.0	средн.11,2	средн. 13,1
никакой #	9	9	5,1	1,3	5,4	1,0	1	<3,3	12,4
	10	9	6,0	8	6,0	17	4	<3,3	13,2
	11	13	5,3	8	5,9	2,1	3	<3,3	11,6
	12	9	5,4	8	5,6	1,0	3	<3,3	11,2
		средн.10	средн.5,5	средн9,2	средн.5,7	средн1,4	средн2,8	средн. <3,3	средн.12,1

^a Средний балл ринореи обозначает сумму баллов за 8 дней (вблизи пика выделения вируса), разделенную на 8. Наивысший балл - 4

NYT – еще не определялся

- Животные, включенные также в таблицы 4, 7 и 10

Таблица 12

Эффективность бляшкообразования 14 мутантов, полученных из RSV cpts-530 и тестированных в клетках HEp-2 при перmissive и ограничивающей температурах по сравнению с контролями

Пример №	Вирус	Титр вируса log ₁₀ PFU/мл при указанной температуре (°C)				Температура выключения (°C) ¹	Малые бляшки при 32°C
		32	35	36	37		
	cp-RSV	6,3	6,3	6,0	6,3	>40	нет
	cpts-530	2,7	2,5	2,4*	2,2**	39	нет
пример 1	530/9	4,4	3,5*	3,0**	<1,0	37	нет

41315

пример 2	530/346	3,1	3,0*	2,3**	<1,0	37	нет
	530/653	2,0	2,5*	<1,0	<1,0	36	нет
	530/667	4,8	4,2*	<1,0	<1,0	36	нет
	530/403	2,6*	<1,0	<1,0	<1,0	35	нет
	530/188	3,2*	<1,0	<1,0	<1,0	35	да
	530/464	3,6*	<1,0	<1,0	<1,0	35	да
	530/1009	4,4	4,4	3,0**	<0,7	37	нет
	530/1178	4,1*	3,8*	2,5**	<0,7	37	да
	530/1074	4,1	4,1*	2,4**	<0,7	37	нет
	530/963	4,5	4,3*	2,3*	<0,7	36	нет
	530/977	4,6	4,2*	0,7*	<0,7	36	нет
	530/1030	3,2*	1,3**	<0,7	<0,7	36	да
	530/1003	3,6	3,0*	<0,7	<0,7	36	нет

* Фенотип малых бляшек (менее 50% от размера бляшек дикого типа)

** Фенотип с точечными бляшками (менее 10% от размера бляшек дикого типа)

¹ Температура выключения определена как самая низкая ограничивающая температура, при которой наблюдается 100-кратное или большее снижение титра бляшек (отчетливые цифры в таблице). Для вирусов, которые имеют при 32°C титр $\leq 2,9$, температура выключения определена как самая низкая температура, при которой вирус не способен образовывать бляшки

Таблица 13

Эффективность бляшкообразования производных ts-1 NG-1

Вирус	Титр (log ₁₀ PFU/мл) при указанных температурах				
	32°	35°	36°	37°	38°C
A-20-4(4-1) ^a	5,9*	1	1	1	1
A-37-8(1-2) ^a	6,3	6,3	1	1	1
A-15-7	3,5	ND	2,1	1,5	1
A-25-8	5,3	ND	5,0*	4,8*	1
A-21	5,1**	ND	4,8**	4,5*	1
ts-1 NG-1	6,6	6,6	6,5	6,6	1

^a Трижды очищены повторяющимся бляшкообразованием

* Фенотип малых бляшек (менее 50% от размера бляшек дикого типа)

** Фенотип точечных бляшек (менее 10% от размера бляшек дикого типа)

ND - не обнаружен

Таблица 14

Репликация родительного вируса ts-1 NG-1 и вирусов потомств в BAL В/с мышах

Вирус	Доза (log ₁₀)	День постинфекционного периода	Титры в легких		Титры в носу	
			32°	38°	32°	38°
A2	6,1	4	4,66 ± 0,32 ^a	4,80 ± 0,16	3,18 ± 0,40	3,29 ± 0,33
		5	5,18 ± 0,33	5,25 ± 2,23	3,40 ± 0,20	3,47 ± 0,14
ts-1 NG-1	5,8	4	4,31 ± 0,17	<2,0	2,82 ± 0,25	<2,0
		5	3,98 ± 0,12	<2,0	2,74 ± 0,31	<2,0

Продолжение таблицы 14

Вирус	Доза (log ₁₀)	День постинфекционного периода	Титры в легких		Титры в носу	
			32°	38°	32°	38°
A-20-4	6,1	4	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
		5	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
A-37-8	6,3	4	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
		5	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0

^a Средний log₁₀ ± стандартная ошибка. 6 животных на группу

Таблица 15

Репликация ts-1 NG-1/A-20-4, ts-1 NG-1, ts-1 или RSV A2 дикого типа
в верхних и нижних дыхательных путях серонегативных шимпанзе

Животное, инфициро- ванное указанным вирусом	Путь иноку- ляции	Коли- чество живот- ных	Извлечение вируса				Ринорея (баллы)	
			Носоглотка		Трахея		Среднее ^c	Пик
			Продол- житель- ность ^b (дни)	Максима- льный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Продолжи- тельность ^b (дни)	Максималь- ный титр (log ₁₀ PFU/мл)		
ts-1 NG-1/A-20-4	IN+IT	15	0	<0,7	0	<0,7	0	0
	IN+IT	16	0	<0,7	0	<0,7	0	0
	IN+IT	17	0	<0,7	0	<0,7	0	0
	IN+IT	18	16 ^d	2,7	0	<0,7	0	0
			средн. 4,0	средн. 1,2	средн. 0	средн. <0,7	средн. 0	средн. 0
ts-1 NG-1	IN	19 ^e	8	4,2	0	<1,1	0,6	1
	IN	20 ^e	7	3,9	0	<1,1	0,7	1
	IN	21 ^e	13	5,4	0	<1,1	0,4	1
	IN	22 ^e	10	5,2	10 ^d	3,7 ^d	0,6	2
			средн. 9,5	средн. 4,7	средн. 0,25	средн. 1,8	средн. 0,6	средн. 1,3
ts-1	IN	23 ^e	16	3,4	0	<1,1	0,4	1
	IN	24 ^e	13	4,4	0	<1,1	1,0	3
	IN	25 ^e	13	5,0	13 ^d	2,2	2,0	4
	IN	26 ^e	10	3,4	0	<1,1	1,0	2
			средн. 13	средн. 4,1	средн. 0,25	средн. 1,4	средн. 1,1	средн. 2,5
дикий тип A2	IN	9 ^f	9	5,1	13	5,4	1,0	1
	IN	10 ^f	9	6,0	8	6,0	1,7	4
	IN+IT	11 ^e	13	5,3	8	5,9	2,1	3
	IN+IT	12 ^e	9	5,4	8	5,6	1,0	3
			средн. 10	средн. 5,5	средн. 9,3	средн. 5,7	средн. 1,4	средн. 2,8

^a IN = только интраназальное; IN+IT = как интраназальное, так и интратрахеальное введение

^b Указывает последний день постинфекционного периода, в который извлекали вирус

^c Средний балл ринореи обозначает сумму дневных баллов за период 8 дней, окружающих день максимального выделения вируса в среду, разделенную на 8. Наивысший балл - 4; самый низкий балл - 0

^d Вирус, выделенный только в указанный день

^e Животные из Crowe et al. Vaccine. in press (1993)

^f Животные из Collins et al., Vaccine 8:164-168 (1990)

Таблица 16

Иммунизация шимпанзе 10⁴ PFU RSV ts-1 Ng-1/A-20-4, ts-1 NG-1 или ts-1
вызывает устойчивость к введению на 28-ой день 10⁴ PFU RSV A2 дикого типа

Вирус, примененный для иммунизации животного	Коли- чество шим- панзе	Извлечение вируса						Титр сывороточных нейтрализующих антител (обратный log ₂) на указанный день	
		Носоглотка		Трахеальный лаваж		Ринорея, (баллы)			
		Продол- житель- ность (дни)	Максима- льный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Продол- житель- ность (дни)	Максима- льный титр (log ₁₀ PFU/мл)	Сред- нее ^a	Пик	28-ой день	42-ой или 56-й день
ts-1 Ng-1/A-20-4	15	0	<0,7	0	<0,7	0	0	<3,3	ожидаемый
	16	0	<0.7	0	<0,7	0	0	<3.3	ожидаемый

41315

	17	0	<0,7	0	<0,7	0	0	6,8	ожидаемый
	18	3	2,0	0	<0,7	0	0	9,7	ожидаемый
		средн. 0,8	средн. 1,0	средн. 0	средн. <0,7	средн.0	средн.0	средн. 5,8	
ts-1 Ng-1	19 ^b	0	<0,7	0	<1,1	0	0	11,4	10,4
	20 ^b	0	<0,7	0	<1,1	0	0	14,4	12,4
	21 ^b	0	<0,7	0	<1,1	0	0	11,8	8,9
	22 ^b	0	<0,7	0	<1,1	0	0	10,2	10,6
		средн. 0	средн. <0,7	средн. 0	средн. <1,1	средн.0	средн.0	средн. 12,0	средн. 10,6
ts-1	23 ^b	0	<0,7	0	<1,1	0	0	10,9	9,8
	24 ^b	0	<0,7	0	<1,1	0	0	12,2	15,8
	25 ^b	5	0,7	0	<1,1	0	0	7,7	9,9
	26 ^b	5	0,7	0	<1,1	0	0	17,7	14,5
		средн. 2,5	средн. 0,7	средн. 0	средн. <1,1	средн.0	средн.0	средн. 12,1	средн. 12,5
никакой	9 ^c	9	5,1	13	5,4	1,0	1	<3,3	12,4
	10 ^c	9	6,0	8	5,0	1,7	4	<3,3	13,2
	11 ^c	13	5,3	8	5,9	2,1	3	<3,3	11,6
	12 ^b	9	5,4	8	5,6	1,0	3	<3,3	11,2
		средн. 10	средн. 5,5	средн. 9,3	средн. 5,7	средн. 1,5	средн. 2,8	средн. <3,3	средн. 12,1

^a Средний балл ринореи обозначает сумму баллов за 8 дней максимального выделения вируса, разделенную на 8. Наивысший балл - 4; самый низкий балл - 0

^b Животные из Crowe et al., Vaccine 1993, in press

^c Животные из Collins et al., Vaccine 8:164-168, 1990

Таблица 17

Эффективность бляшкообразования производных ts-4

Штамм	Титр вируса (log ₁₀ PFU/мл)				
	32°	35°	36°	37°	38°
ts-4/F-15-8	6,0	5,9*	6,0*	2,0 ^a	2,0
ts-4/F-19-1	5,5	5,3*	5,4*	2,0	2,0
ts-4/F-20-7	6,1	6,1*	6,1*	2,0 ^a	2,0
ts-4/F-29-7	5,8	2,0	2,0	2,0	2,0
ts-4/F-31-2	5,6	2,0 ^a	2,0 ^a	2,0	2,0
ts-4 (родитель)	6,1	6,3	6,3	6,1	2,0

^a Мутное пятно

* Фенотип малых бляшек (менее 50% от размера бляшек дикого типа).